

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Obor: Biologie



Kristian Kříž

Využití virových nanočástic pro biomedicínské účely
The application of viral nanoparticles in biomedicine

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha 2014

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Haně Španielové za odborné konzultace, trpělivost a podporu při psaní této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 22.8. 2014

Podpis:

Osnova

Abstrakt

Seznam zkratk

1. Úvod	6
2. Virové částice a jejich vlastnosti	7
2.1 Biokompatibilita virových nanočástic	7
2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti virových částic	9
2.3 Modifikace virových nanočástic povrchu	9
2.3.1 Polyethylenglykol	9
2.3.2 Příklady dalších krycích polymerů	10
2.3.2.1 Polyaminokyseliny	10
2.3.2.2 Chitosan	11
2.4 Modifikace virových nanočástic ligandy	11
2.5 Efekt modifikací na farmakokinetické vlastnosti virových nanočástic	13
2.5.1 Faktor velikosti	13
2.5.2 Faktor náboje	13
2.5.3 Faktor tvaru	14
2.5.4 Faktor umístění	14
3. Využití virových nanočástic k léčbě nádoru	14
3.1 Odlišný proteom	15
3.2 Odlišné pH	18
3.3 Odlišná teplota	19
3.4 Mechanismus uvolnění terapeutika	19
3.5 Fotodynamická likvidace nádorových buněk	20
4. Využití virových nanočástic diagnosticky	21
4.1 Fluorescence	21
4.2 Magnetická resonance	23

4.3 Pozitronová emisní tomografie	24
5. Virové nanočástice jako mikrobicidní a antivirový prostředek	24
5.1 Virové nanočástice jako prostředky pro boj s virovými onemocněními	24
5.2 Virové nanočástice jako nosiče bakteriocidních látek	25
6. Chimérické virové nanočástice jako antitoxin	25
7. Virové nanočástice pro ovlivnění endogenních molekul	26
7.1 Virové nanočástice jako koagulans	26
7.2 Virové nanočástice pro léčbu aterosklerózy	27
7.3 Virové nanočástice pro léčbu obezity	27
7.4 Virové nanočástice pro léčbu autoimunitních onemocnění	28
8. Virové nanočástice jako nanoreaktory	28
9. Virové nanočástice pro extraci rekombinantních protein	29
10. Virové nanočástice jako templáty pro kovové nanočástice	30
11. Virové nanočástice pro výrobu elektrických článků	31
12. Závěr	32
13. Reference	33

Abstrakt

Tato práce shrnuje výsledky studií vedoucích k novým aplikacím virových nanočástic s důrazem na použití v medicíně. Nejprve se práce věnuje charakteristice virových nanočástic a některým obecným aspektům nanočástic. Dále jsou zde popsány vybrané studie užívající virové nanočástice jako prostředek k léčbě nádorů, virových, bakteriálních nebo jiných onemocnění. Tato rešerše také obsahuje příklady prací, při kterých byly virové nanočástice použity k diagnostickým účelům. Nakonec jsou zde zmíněny i studie, ve kterých virové nanočástice sloužily jako nanoextraktory, nanoreaktory nebo nanotempláty pro syntézu kovových nanočástic a galvanických článků.

Klíčová slova

Virová nanočástice, VNP, viru podobná částice, VLP, biomedicína, modifikace

Abstract

This work compiles studies that lead to new applications of viral nanoparticles with an emphasis on utilization in biomedicine. Firstly the work follows the characteristics of viral nanoparticles and some general aspects of nanoparticles. Further described herein are exemplary studies that are using viral nanoparticles as a tool for the treatment of cancer, viral, bacterial or other diseases. This review also includes examples of researches leading to the usage of viral nanoparticles for diagnostic purposes. Lastly, studies in which viral nanoparticles served as nanoextractors, nanoreactors or nanotemplates for the synthesis of metal nanoparticles and galvanic cells are mentioned here too.

Keywords

Virus nanoparticle, VNP, virus-like particle, VLP, biomedicine, modification

Seznam zkratek

AAV ₂	adeno asociovaný virus 2
ANTHR2	receptor toxinu anthraxu 2
CCMV	virus chlorotických skvrn vigny
CPMV	virus mozaiky vigny
CuAAC	azid-alkynová cykloadice katalyzovaná Cu
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FHV	flock house virus
GFP	zelený fluorescenční protein
GIP	žaludeční inhibiční polypeptid
HeLa buňky	buňky Henrietty Lacks (buněčná linie nádoru)
HER2	lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2
HIV	lidský imunodeficienční virus
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL-1	interleukin-1
LT	velký T antigen
miRNA	microRNA
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
NHS reakce	N-Hydroxysukcinimidová reakce
PA	ochranný antigen
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie
PHEA	poly (hydroxyethyl-L-asparagin)
QD	kvantové tečky
shRNA	malá vlásenková RNA
siRNA	malá interferující RNA
SV40	opičí virus 40
Tat	transaktivační regulační protein
TMV	virus tabákové mozaiky
VLP	viru podobná částice
VNP	virová nanočástice
VP	virová částice
VP1	virový protein 1
VP2	minoritní kapsidový protein
VWA	von Willebrandův faktor A

1. Úvod

Viry jsou vnitrobuněčné parazitické entity, které dokáží selektivně adherovat na povrch hostitelské buňky, pronikat plazmatickou membránou, dopravovat svůj genom do nitra buňky a využívat buněčné zdroje k autoreplikaci. Z biochemického hlediska jsou to samoorganizující se molekulární stroje, které svými rozměry většinou nepřesahují desítky až stovky nanometrů. Díky tomu se viry dostávají do centra pozornosti nejen jako patogeny, ale také jako nástroje výzkumu v oblasti nanotechnologií. Viry lze využít kromě přípravy antivirových vakcín také k tomu, k čemu byly evolucí předurčeny, k dopravě genetického materiálu do recipientních buněk. Při genové terapii lze pomocí virových vektorů dopravovat například geny pro defektní či chybějící enzymy, při protinádorové terapii sebevražedné geny a při vakcinačních strategiích kupříkladu DNA pro antigeny. Viry lze využít ale i k dopravě miRNA (z angl. microRNA) nebo siRNA (z angl. small interfering RNA), které mohou regulovat nádory či interferovat s patogenní virovou expresí. Transportovaným materiálem ale nemusí být jen nukleová kyselina, pomocí virových struktur lze do buněk dopravovat i nízkomolekulární látky pro terapeutické a diagnostické účely.

Pro klinické použití však musí být tyto virové nástroje dostatečně bezpečné a účinné. Proto jsou virové částice před použitím upravovány tak, aby byl odstraněn jejich patogenní potenciál, omezena případná toxicita, optimalizována biodistribuce a zvýšena specifita pro zamýšlené použití. Jen vyjíměčně, například při některých typech onkolytické léčby, je žádoucí dopravovat do organismu celistvý, neupravený nebo téměř celistvý virový genom. V ostatních případech je genom viru upraven nebo zcela odstraněn a virové částice mohou být používány pro dopravu heterologní nukleové kyseliny nebo nukleovým kyselinám zcela nepříbuzných látek. Viry jsou pak používány jako pouhé přepravní schránky, jejichž virové proteiny jsou modifikovány podle zamýšlených aplikací. A nakonec, jak poukazují některé recentní studie, je kromě těchto využití možné nalézt pro viry a částice od nich odvozené i uplatnění v jiných oblastech než v nanomedicině.

Cílem této práce je především shrnout informace týkající se nových možností využití virových nanočástic v biomedicině. Virové vektory pro genovou terapii, které již v mnoha případech dosáhly klinických studií, využití virů pro přípravu tradičních vakcín a využití virů k onkolytickým léčbám nejsou předmětem této práce a tyto témata budou zmíněny jen okrajově. Práce se soustředí na publikovaná data směřující k praktickému použití virových nanočástic jako nanokontejnerů nebo nanonosičů, ale jsou zde zmíněny i využití virových nanočástic jako nanoreaktorů, nanotemplátů a nanoextraktorů.

Vzhledem k rozsáhlosti experimentálních dat nelze detailně popsat všechny publikované práce, a proto jsou vybrány jen příklady ilustrující konkrétní použití. Tímto se omlouvám všem výzkumným skupinám zabývajících se touto tematikou jejichž příspěvek zde nebude uveden, ačkoli může být stejně zásadní jako výzkum zde uvedený.

2. Virové částice a jejich vlastnosti

Virus obsahuje RNA nebo DNA genom, který je zabalený v proteinovém plášti, v kapsidě. Kapsida je tvořena kapsidovými proteiny vzájemně vázanými nekovalentními interakcemi. Tyto proteiny mohou být monomerní nebo se uspořádávat do oligomerů. Některé viry mají lipidický obal obklopující kapsidu. Funkce kapsidy nebo lipidického obalu jsou ochrana genomu viru v extracelulárním prostředí a podpora proniknutí viru do vhodné buňky.

Pro virové systémy používané pro biomedicínské účely se v posledních letech používají různá označení. Pojem VPs (z angl. viral particles) je obecné označení pro částice virového původu. Pojem VNPs (z angl. virus nanoparticle) se nejčastěji označují nanočástice virového původu modifikované za účelem jejich dalších aplikací v příslušných oblastech nanomedicíny a nanotechnologie.

Takové VNPs, které neobsahují žádnou virovou DNA nebo RNA, se nazývají VLPs (z angl. virus like particles) (Pokorski a Steinmetz 2011). V některých případech dokonce nemusí VLPs obsahovat všechny složky kapsidy, ale pouze ty nezbytně nutné pro zachování stability částice (tj. VLPs mohou postrádat minoritně zastoupené strukturní proteiny viru). Takové částice jsou někdy nazývány pseudokapsidy (Forstová *et al.*, 1995). V případech, kdy je do VLP zpětně inkorporována heterologní nukleová kyselina, se někdy v literatuře používá též pojem pseudovirion (Ou *et al.*, 1999). Terminologie je však v tomto směru velmi nejasná.

2.1 Biokompatibilita virových nanočástic

Biokompatibilita substance je podle doporučené terminologie z r. 2012 Vert *et al.*, "schopnost být v kontaktu s živým systémem bez negativního působení". Biokompatibilní substance tedy nevyvolávají silnou imunitní reakci, nejsou toxické a jsou biodegradovatelné. V případě VNPs je toxicita velkým dílem dána právě interakcí s imunitním systémem. Jiné příčiny toxicity VNPs mohou být způsobeny pomnožením v buňce, syntézou toxických produktů

(<<http://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Mechanis.htm>>, 5.8. 2014) nebo v určitých případech usazováním v orgánech (Steinmetz, 2010; Ferguson *et al.*, 2012).

Cytotoxicita VNPs způsobená pomnožením v buňce připadá v úvahu jen u replikativně kompetentních VNPs užívaných například při onkolytických virových léčbách. V tom případě je ale cytotoxicita vlastností žádanou. Některé strukturní proteiny virů, tedy i VLPs od takových virů odvozených, mohou působit cytotoxicky. Například adenovirový fiber protein (adenovirový protein vlákna) inhibuje RNA a DNA polymerázy komplexací templátem (Levine a Ginsberg, 1967). Rovněž adenovirový RGD tripeptid způsobuje morfologické změny infikované buňky (Bai *et al.*, 1993). Dalším příkladem mohou být glykoproteiny *Herpes simplex* indukující tvorbu syncytií (C-Fiume *et al.*, 1988).

Biodegradovatelnost je schopnost substance být degradována biologickou aktivitou (adaptováno z Vert *et al.*, 2012). Jelikož VNPs mají společnou proteinovou povahu, lze předpokládat, že budou všechny podobně dobře biodegradovatelné. Studie Tóthová *et al.*, (2012) například potvrzuje předpoklad dobré degradovatelnosti pro fága M13. Obsáhlá komparativní studie biodegradovatelnosti různých virů však zatím provedena nebyla.

Imunogenita je schopnost substance vyvolávat humorální nebo buněčnou imunitní reakci v živém systému (adaptováno z Vert *et al.*, 2012). A protože jsou VNPs složené z proteinů, vytváří se proti nim humorální imunitní odpověď spíše než proti jiným neproteinovým typům nanočástic. A tato odpověď nabývá na síle s opakovaným podáváním. Jak ukázal tragický případ J. Gelsingera, může být tato reakce individuálně variabilního rozsahu, což může představovat vážné zdravotní riziko. Gelsinger byl jedním z prvních pacientů léčených virovými vektory, u kterých bylo podání vektorů nitrožilní. I když byl vystaven dávce jen o málo větší než pacient, u něhož nenastaly žádné komplikace, objevila se u Gelsingera silná imunitní reakce proti VNPs, v důsledku které zemřel. Mezi navržené příčiny neočekávaně silné reakce v tomto případě patří, že imunogenita roste s dávkou nelineárně a velmi prudce u vyšších dávek VNPs, že Gelsinger byl nositel kryptické genetické anomálie, že trpěl parvovirovou infekcí nebo že se jeho imunitní systém v minulosti s antigenem již setkal (Marshall, 1999; Raper *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003). V případech, kdy není vhodná aplikace in vitro přicházejí ke slovu jiné strategie minimalizace imunogenity. Mezi různými VNPs existuje značná variabilita v jejich imunogenitě (Cotter a Muruve, 2005; Singh *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2013). A pro určitá biomedicínské použití mohou být jako málo imunogenní vybrány například ty VNPs odvozené od bakteriofágů nebo rostlinných virů (Steinmetz NF. 2010). Imunitní reakce proti těmto VNPs je slabší v porovnání například s imunitní reakcí proti VNPs odvozených od lidských virů, nejspíš protože lidský imunitní systém nebyl nikdy s těmito viry v koevolučním vztahu. Další

příklad minimalizace imunitní reakce může představovat užití neimunogenních polymerů ke krytí virové nanočástice.

2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti virových nanočástic

VNPs vytvářejí monodisperzní částice, mají tedy uniformní velikost, a lze mezi VNPs najít i zástupce se striktně uniformním tvarem (Steinmetz, 2013). Tyto vlastnosti mohou být relevantní pro některé biomedicínské aplikace, neboť se spontánně negenerují abnormální partikule s posunutým spektrem farmakokinetických parametrů daných změnou velikosti a tvaru.

VNPs jako proteinové nanočástice je možné snadno chemicky modifikovat konjugací reaktivních zbytků postranních řetězců aminokyselin s molekulou zájmu. Jediná VNP může být takto modifikovaná na mnoha místech, VNPs jsou multivalentní (Venter *et al.*, 2011). Navazání více molekul zájmu, ligandů, na jednu nosičovou VNP umožňuje relativní zvýšení efektu ligandu oproti ligandu přenášeným monovalentním nosičem. Tímto zvýšeným efektem může být například internalizace buňkou, je-li přenášený ligand ligandem buněčného receptoru (Wen *et al.*, 2013). Kromě chemických úprav jsou u virových částic možné také úpravy genetické (Wang *et al.*, 2002). Riziko genetických modifikací VNP je možnost destabilizace kapsidy (Udit *et al.*, 2009).

2.3 Modifikace povrchu virových nanočástic

Všechny systémově podávané nanočástice jsou z organismu odstraňované buňkami retikuloendoteliálního systému, popřípadě se kumulují v orgánech. Snížení imunogenity a prodloužení doby, po kterou jsou částice schopny v organismu cirkulovat, lze dosáhnout pomocí tzv. krycích polymerů. V dnešní době je asi nejčastěji používaný krycí polymer polyethylenglykol.

2.3.1 Polyethylenglykol

PEG, neboli polyethylenglykol či poly(ethylenoxid) je hydrofilní polymer jednotek HO–(CH₂CH₂O)_n–CH₂CH₂–OH (van Vlerken *et al.*, 2007). PEG může být s nanočásticí připojen kovalentně, ale i spontánně adsorbovat na její povrch (Owens III. a Peppas, 2006). Taková asociace pak zabraňuje další adsorpci sérových proteinů a tím i nespecifické endocytóze všemi buňkami. Zabraňuje také adsorpci opsoninů, která vede k následnému odstranění částic z oběhu buňkami retikulárně endoteliálního systému, čímž je zvýšena cirkulační doba nanočástice v těle (Chaudhari

et al., 2012; Owens III. a Peppas 2006; Lundqvist *et al.*, 2008). PEG dokáže u nanočástice minimalizovat adsorpci sérových proteinů až do hmotnostního podílu PEGu v nanočástici přibližně 5%. Při překročení této hodnoty dojde k nasycení a další zvýšení podílu PEGu ku celkové hmotnosti nanočástice adsorpci neovlivňuje (Gref *et al.*, 2000). Jako hydrofilní polymer vylepšuje PEG také rozpustnost nanočástic, se kterými je asociován, ve vodě a výsledný posun hydrofobicity nanočástice vyvolané asociací s PEGem také přispívá k horší internalizaci makrofágy (Carrstensen *et al.*, 1992). Omezení adsorpce sérových proteinů a snížení endocytického potenciálu však může vést k omezení interakcí s cílovými buňkami (Du *et al.*, 1997). Tato skutečnost je známa jako "PEG dilemma" (Hatakeyama *et al.*, 2013). Tuto komplikaci je možno vyřešit odštěpením krycího polymeru před vstupem do cílové buňky. Existují způsoby, jak toho dosáhnout např. pomocí pH-labilní vazby mezi PEGem a nanočásticí, jak ukázali pro PEG-fosfatidylethanolaminové nanočástice Sawant *et al.*, (2006). Další takový způsob je proteolytickým štěpením PEGu na cílové buňce, což bylo experimentálně prověřeno pro liposomové nanosystémy (Tereda *et al.*, 2006). Ve vysokých dávkách může být PEG toxický, ale pouze při koncentracích mnohonásobně vyšších, než které se předpokládají při klinickém použití (Webster *et al.*, 2009, Pellegrini *et al.*, 2013). Překvapivě, ačkoliv byl PEG považován za molekulu neimunogenní, naopak imunitní reakci zamezující, u zvířat i člověka byla prokázána tvorba anti-PEG IgM a IgG protilátek (Richter a Akerblom, 1984; Hu *et al.*, 2011).

2.3.2 Příklady dalších krycí polymerů

2.3.2.1 Polyaminokyseliny

Alternativou PEGu jako krycí molekuly mohou být polyaminokyseliny. Podle skupiny Romberg *et al.*, (2007) jsou farmakokinetické vlastnosti liposomů pokrytých poly(hydroxyethyl-L-asparagin)em (PHEA) lepší než těch pokrytých PEGem. V jejich studii byly porovnány oba nanosystémy při různých koncentracích a při opakovaných podáních laboratornímu zvířeti (kryse). Ukázalo se, že při nižších koncentracích-0,25 a 0,025 mikromolů/kg bylo za 24 hodin PHEA liposomů v systému asi 2,5 krát více než PEGem pokrytých (PEGylovaných) liposomů. Při opakovaných podáních (testovány byly pouze vyšší dávky 5, 10, 20 mikromolů/kg) byly PEG liposomy ze systému odstraňovány daleko rychleji. Obě nanočástice měly také odchylnou biodistribuci v orgánech. Výsledky chování nanosystémů při opakovaných podáních jsou velmi překvapivé, jelikož proti polyaminokyselinám, proteinům se předpokládá ve srovnání s ostatními polymery největší vznik protilátek.

Možná hypotéza vysvětlující tyto výsledky, kterou navrhuje autor této rešerše je následující.

Vzhledem k tomu, že jsou všechny monomery hydrofilního krycího polymeru stejné, měly by být

jejich možné vzájemné interakce energeticky rovnocenné (neuvažujeme-li sterické pnutí). V takovém případě by vzniklé konformace byly variabilní mezi jednotlivými nanočásticemi a rozpuštěné v hydrofilním solventu by se i často měnily i v rámci jedné nanočástice. Taková heterogenita spolu se skutečností, že hydrofilní látky obecně jsou pro makrofágy hůře internalizované by mohly být faktory přičiňující se k úniku nanočástice před protilátkovou imunitní odpovědí.

2.3.2.2 Chitosan

Další polymer použitelný pro krytí nanočástic je chitosan, derivát chitinu vzniklý jeho deacetylací (Marguerite *et al.*, 2006). Samotný se používá jako vektor při genových terapiích a při dopravě léčiv (ve formě nanočástice tvořené polymery chitosanu), také jako biosenzor, při tkáňovém inženýrství a v dalších aplikacích (Hamman *et al.*, 2010). Asociovaný s virovou nanočásticí byl chitosan použit ke zlepšení adheze k mukózním povrchům a k zvýšení stability VLP použité k vakcinaci proti norovirům (Kissmann *et al.*, 2008, EL-Kamari *et al.*, 2010). Míra biodegradovatelnosti chitosanu závisí na formě, v jaké se používá. Samotný chitosan je však relativně dobře biodegradovatelný (Hamman *et al.*, 2010). Chitosan může snižovat toxicitu podávané nanočástice (Worthington, 2013), ale může také indukovat zánětlivou imunitní reakci (Worthington, 2013; Peluso, 1994). Asociace nanočástice s chitosanem nebo obecně s jiným dnes pro tyto účely používaným polymerem prodlužuje cirkulační dobu nanočástice (Parveen a Sahoo, 2011).

2.4 Modifikace virových nanočástic ligandy

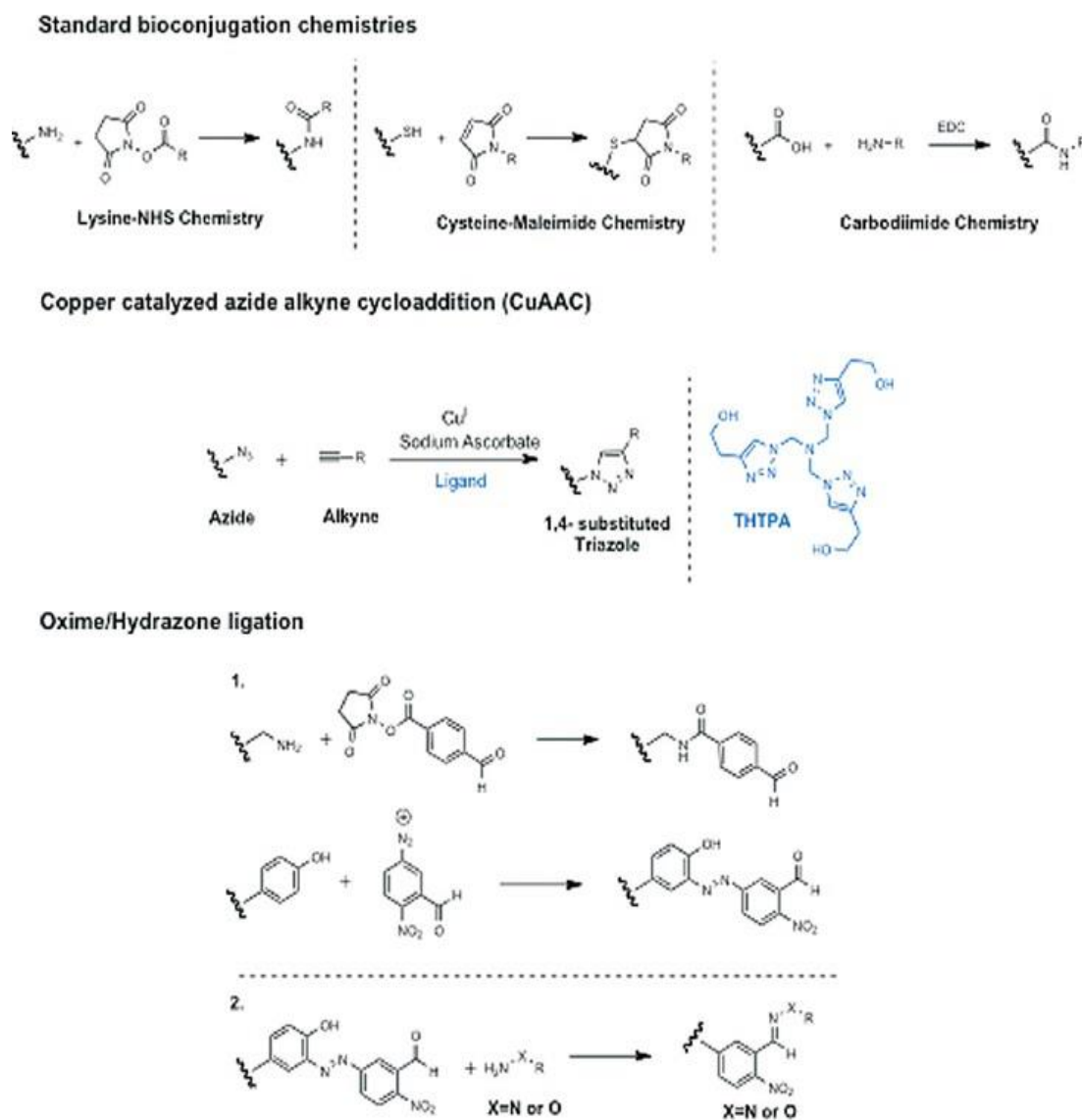
V dnešní době bývají jako VNPs pro medicínské účely používány VNPs odvozené od virů rostlin a bakterií, které většinou nemají přirozenou afinitu k lidským buňkám. Navíc užitím krycích polymerů je do značné míry inhibována internalizace nanočástic všemi buňkami, tedy i cílovými buňkami. K překonání těchto bariér bývají na povrch VNPs inkorporovány ligandy receptorů exprimovaných na léčených buňkách jako kyselina listová, receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR, epidermal growth factor receptor), peptidy vážící integriny, aj. (kap. 4., 5., 6.).

Důležitý aspekt těchto modifikací je, že jimi může snadno dojít ke změně vlastností bioaktivního ligandu. Podle práce Patel a Swartz, (2011) například došlo po modifikaci Q β VLP konjugací s cytokinem k několikanásobnému útlumu bioaktivity ligandu.

Připojení molekuly k nanočástici může probíhat buď chemicky nebo geneticky. Chemickou úpravou je možné přidat i látku neproteinové povahy. Nejčastější typy chemických reakcí používaných k modifikaci kapsidy VNPs jsou karbodiimidová reakce, lysin-N-Hydroxysukcinimidová

reakce (lysine-NHS reakce), cystein maleimidová reakce, azid-alkynová cykloadice katalyzovaná Cu (CuAAC) a hydrazonová ligace (viz obr.1.) (Pokorski a Steinmetz, 2011).

Genetické modifikace se dají použít jednak k vložení aminokyselin, jejichž postranní řetězce jsou pak cílem následných chemických reakcí, nebo přímo k fúzi kapsidového proteinu s libovolným jiným proteinovým ligandem. Možná komplikace při genetických modifikacích VNPs je destabilizace kapsidy (Udit *et al.*, 2009).



Obr.1. Vvybrané konjugační chemické reakce. Upraveno z Pokorski a Steinmetz, (2011).

2.5 Efekt modifikací na farmakokinetické vlastnosti virových nanočástic

Obalení krycím polymerem nebo připojení libovolné molekuly k VNP zároveň mění její parametry jako jsou velikost, geometrie, popřípadě náboj. K modifikacím VNP nelze přistupovat bez rozmyslu, neboť velikost, geometrie a náboj, popřípadě i jiné parametry ovlivňují kvalitativně interakce s organismem, na který se má VNP aplikovat. Na své cestě organismem asociují nanočástice s proteiny, které kolem nanočástic vytvářejí tzv. proteinovou korunu. Ta pak do značné míry určuje interakce s organismem. Například je-li v koruně obsaženo mnoho ligandů receptorů konkrétních buněk, pak budou nanočástice prostřednictvím korony více asociované s těmito buňkami. Modifikace VNP mění i spektrum asociovaných proteinů a tím i farmakokinetické vlastnosti nanočástice (Lundqvist *et al.*, 2008; Treuel *et al.*, 2014).

2.5.1 Faktor velikosti

Několika nezávislými experimenty bylo odhadnuto, že optimální internalizační velikost nančástice se pohybuje kolem 40 nm (Chithrani *et al.*, 2006; Varela *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2008). Menší částice poskytují příliš málo ligandů (Jiang *et al.*, 2008), naopak větší přílišnou deformací membrány a vysycením receptorů interferují s internalizací (Albanese *et al.*, 2012). Větší nanočástice vyvolávají silnější imunitní odpověď (Stano *et al.*, 2012; Prietl a kol. 2014), pro nanočástice pod 25 nm však může platit opačný trend (Yen *et al.*, 2009). Menší nanočástice jsou zase toxičtější (Avalos *et al.*, 2014; Gliga *et al.*, 2014) a pronikají hlouběji do tkání, ale také jsou rychleji renálně odstraňovány (Choi *et al.*, 2007). Velikost též ovlivňuje sekvestraci v konkrétních orgánech (Zhang *et al.*, 2011; Hirn *et al.*, 2011)

2.5.2 Faktor náboje

Kladně nabitě částice lépe pronikají do buněk (Harush-Frenkel *et al.*, 2007). Může docházet až k fyzickým penetracím membrány (Leroueil *et al.*, 2008) patrně vlivem rozdílu potenciálů. Na druhou stranu jsou záporně nabitě částice internalizovány o něco lépe než částice neutrální (Villanueva *et al.*, 2009). Kladně nabitě nanočástice se ukazují cytotoxičtější (Bhattacharjee *et al.*, 2012). Překvapující je, že i některá povrchová uspořádání nabitých ligandů vůči nenabitým mohou být endocyticky preferována (Verma *et al.*, 2008).

2.5.3 Faktor tvaru

Nefagocytující buňky internalizují efektivněji částice protáhlejší, tj. s větším poměrem jednoho rozměru k druhému (Karaman *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2013). U fagocytujících buněk byla ale zaznamenána opačná tendence (Champion a Mitragotri, 2009; Champion a Mitragotri, 2006). Podle výzkumu, ve kterém figurovaly řádově menší nanočástice, kolem 50 nm, byly ty kvádrového tvaru internalizovány lépe než sférické nebo kubické částice. I přes jejich lepší internalizaci vyvolaly kvádrové nanočástice slabší imunitní odpověď (Niikura *et al.*, 2013a).

Komparativní studie vlivu těchto parametrů na farmakokinetiku pro virové nanočástice zatím nebyly uskutečněny. Předpokládá se patrně, že závislosti zjištěné experimenty s nevirovými nanočásticemi budou na VNPs extrapolovatelné.

2.5.4 Faktor umístění

VLP je možné modifikovat tak, že ligovaná molekula se bude nacházet na vnějším nebo vnitřním povrchu kapsidy. Lze předpokládat, že molekula umístěná v lumen VLP (uvnitř kapsidy) mění farmakokinetické vlastnosti méně než stejná molekula připojená exteriorně. Toto také ověřila práce Wen *et al.*, (2012a), ve které byly VLPs odvozené od virů mozaiky vigny (CPMV, cowpea mosaic virus) interiorně a exteriorně modifikovány fluorofory, biotinem a polymery. Ve vnitřku upravené VLPs vykazovaly lepší internalizaci rakovinnými buňkami než VLPs upravené na vnějším povrchu. U molekul, které nezbytně nemusí být připojené k povrchu VNP, může být tedy optimální jejich doprava uvnitř kapsidy.

3. Využití virových nanočástic k léčbě nádoru

Mikroprostředí nádoru se často vyznačuje signifikantními odlišnostmi od zbytku těla v biologických a chemických charakteristikách jako proteinové složení, pH, teplota (Torchilin, 2009). Těchto odlišností je možné využít při konstrukci nádorově specifických transportních systému pro dopravu protinádorových látek do buněk nádoru. Pro virové nanosystémy jsou dnes zkoumány především strategie založené na odlišném proteomu nádorových buněk v porovnání s odpovídajícími zdravými buňkami, ale již byly vykonány experimenty využívající i jiné z uvedených charakteristik pro potenciální budoucí aplikace.

Další důležitou charakteristikou rakovinných tkání je konstitutivní angiogeneze, která dává vznik aberantním cévám (Hanahan a Weinberg, 2011). Abnormální morfologie cév pak způsobuje hromadění nanočástic v nádorech známé jako efekt zvýšené propustnosti a retence (z angl. enhanced permeability and retention effect) (Greish, 2010). Příčina tohoto efektu může být pro nanočástice bazické povahy kromě odlišné morfologie cév také agregace těchto nanočástic v blízkosti nádoru vlivem sníženého pH (Won a Lee, 2013). Hromadění nanočástic v nádorech je pro terapie založené na VNPs velmi výhodné, protože zvyšuje podíl nádorových buněk zasažených terapeutikem ku všem buňkám těla terapeutiku vystaveným.

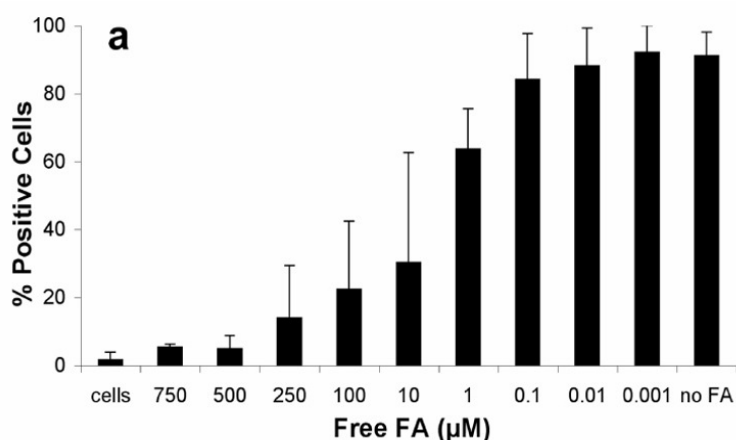
Vlastní terapeutické působení VNPs specificky cílovaných na nádorové buňky spočívá nejčastěji v asociaci chemicky nebo biologicky aktivních látek, toxinů, interferujících RNA, aj. s VNPs. Pokud je uvolnění terapeutika v nádorové tkáni problematickým krokem, může být uvolnění dosaženo například asociací terapeutika s VLP redoxně senzitivní vazbou. Zajímavou alternativou dopravy biologicky nebo chemicky aktivních látek do buněk nádoru je asociace VNPs s fyzikálně aktivními látkami, jak je tomu u fotodynamické destrukce nádoru.

3.1 Odlišný proteom

Nádorové buňky se od odpovídajících zdravých buněk odlišují svým expresním profilem. Buď nejsou zdravými buňkami určité proteiny produkovány vůbec, nebo v jiné míře než v rakovinných buňkách. Odlišnost je však většinou příliš malá, než aby proti nádoru imunitní systém zakročil, a tím dojde k navození tolerance (Hořejší a Bartůňková, 2009). Nicméně na těchto odlišnostech jsou založeny strategie léčby nádorů pomocí VNPs. Často používanou technikou při léčbě nádorů pomocí VNPs je asociace VNP s ligandem receptoru vyskytujícím se na povrchu nádorových buněk, čímž bývá dodána specifita vůči transformovaným buňkám.

Jedni z prvních kdo použili nádorově specifický ligand konjugovaný s VLP byli Destito *et al.*, (2007). Touto výzkumnou skupinou byl exteriorně k CMPV VLP konjugový CuAAC reakcí prostřednictvím PEG linkeru folát. Tím bylo VLP umožněno vnikat specificky do buněk exprimujících folátový receptor. Folátový receptor, receptor důležitého vitamínu, bývá často exprimovaný ve zvýšené míře v buňkách nádoru (Wang a Low, 1998). Samotná CPMV VLP nemodifikovaná PEGem vykazuje přirozenou afinitu k vimentinu, jak ukázali Koudelka *et al.*, (2009). Mají tedy potenciál interagovat s lidskými buňkami, a to především s buňkami mezenchymálními, migračními nebo nádorovými (Satelli a Li, 2011). Avšak štítním VLP pomocí PEGu je tato schopnost víceméně nespecifické interakce omezená (Du *et al.*, 1997). Tím, že byla PEG-VLP konjugovaná s

folátem, měla by tato VLP být schopna interagovat s lidskými buňkami exprimujícími folátový receptor, a to více specificky. To se také prokázalo, když nechali výzkumníci interagovat takovéto CMPV-PEG-folátové VLPs s buňkami rakovinných linií HeLa a KB. Kromě toho, že s folátem konjugované PEG-VLPs byly internalizované lépe než nekonjugované PEG-VLPs, korelovalo množství internalizačních událostí s presumptivní mírou exprese folátového receptoru v testovaných buněčných liniích. V rámci výzkumu byla prověřena i možnost konjugovat folát přímo k VLP (NHS reakcí). Takto modifikované VLPs však nebyly internalizovány nádorovými buňkami lépe než nemodifikované. Délka linkeru tedy patrně ovlivňuje schopnost VLP, která je modifikována ligandem, být internalizovaná.



Obr. 2. Folátem zprostředkovaná internalizace

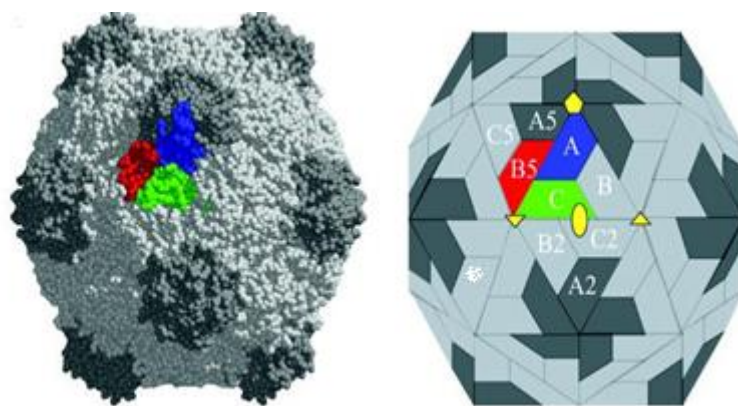
Diagram ukazuje, že jde o folátem indukovanou internalizaci. V přítomnosti volného folátu (horizontální osa, osa x) došlo k obsazení folátových receptorů a podíl buněk internalizujících VLP (vertikální osa, osa y) se s jeho rostoucí koncentrací (zprava doleva) snížil (převzato z Destito *et al.*, 2007).

CPMV VLP byla rovněž použita ve výzkumu Hovlid *et al.*, (2012), ve kterém byla VLP modifikována adenovirovým proteinem obsahujícím RGD tripeptid. RGD tripeptid je ligandem integrinu (Castel *et al.*, 2001). Vyprodukované částice pak byly specificky endocytovány buňkami HeLa a buňkami několika dalších rakovinných typů. Ukázalo se, že nemodifikované VLPs vyvolaly v internalizujících buňkách jen přibližně 30% fluorescenční aktivity relativně k virovým nanočásticím modifikovaným proteinem obsahujícím RGD sekvenci.

Na možnost zvýšení exprese integrinů nádorovými buňkami vyvolané ozářením poukázali Hallahan *et al.*, (2003) ve svém výzkumu. Tato studie se netýkala virových nanočástic, ačkoli v ní byly použity virové ligandy integrinu k zajištění specifity. Vzhledem k tomu, že radioterapie se dnes

při léčbě nádoru používá běžně, nabízí se možnost kombinace radioterapie s léčbou pomocí nanosystému využívajících cílování pomocí ligandu integrinu, tedy také pomocí VLPs.

Další příklad takovýchto prací je výzkum Ashley *et al.*, (2011) zabývající se nejen schopností internalizace VLPs buňkou, ale i možností VLPs nést terapeutickou substanci. V této studii byly VLPs odvozené od bakteriofága MS2 asociované s dopravovanými látkami *in vitro* složením. Této asociace bylo dosaženo konjugací dopravovaných látek s pac site RNA, která zprostředkovává složení kapsidy. Tyto VLPs byly modifikované lysin-NHS reakcí peptidem SP94, který zajišťoval specifitu k buňkám hepatokarcinomových linií (Lo *et al.*, 2008) na které byly tyto VLPs aplikované, a fuzogenním peptidem H5WYG. Dopravené látky byly anticyklinové siRNA, fluorofory, QD, toxin ricin A, doxorubicin a další toxiny. Životaschopnost zasažených buněk karcinomu drasticky poklesla (téměř o 100%). Životaschopnost nenádorových hepatocytů, které byly rovněž vystaveny těmito VLPs, nebyla výrazně postižena.



Obr.3. Kapsida viru CPMV

CPMV má 30-ti nm ikosahedrální kapsidu s pseudo- $T=3$ triangulací, která sestává z větších L a menších S podjednotek. L Podjednotka tvoří B a C β -sandwich doménu, S podjednotka jen A β -sandwich doménu (upraveno z Lin a kol. 1999).

Odlišného proteomu nádorových linií lze využít i jinak než k cílování VLP na buňky prostřednictvím ligandů. Kupříkladu v rámci práce Pouyanfard *et al.*, (2012) byly sestaveny chimérické VLPs odvozené od bakteriofága T7 nesoucí peptid p66 z lidského EGF receptoru HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), exprimovaného ve zvýšené míře použitou nádorovou linií karcinomu prsu. V xenogenních myších imunizovaných touto VLP pak docházelo k signifikantní lyzi transplantovaných buněk nádoru. Kontrolní zvířata nebyla chráněna vůbec a zvířata imunizovaná volným antigenem p66 přežívala méně než ta imunizovaná VLP-p66 (33% přeživších imuni-

zovaných volným peptidem, 83% přeživších imunizovaných VLP-p66). Jedná se v podstatě o jakousi formu očkování proti nádoru, při kterém byly VLPs nosiče antigenu.

Další ze strategií využívající odlišný proteom může být založená na tom, že nádorové buňky často exprimují ve zvýšené míře určité proteázy, například matrixové metaloproteinázy. Těch pak může být využito ne jako receptoru, ale k štěpení specifických aminokyselinových sekvencí. Například ve výzkumu skupiny Peng *et al.*, (1997) byly retrovirové vektory spojené s EGF prostřednictvím proteinového linkeru, který jsou metaloproteinázy schopny štěpit. EGF umožnil vektorům asociaci s buňkami nádorové linie, avšak nedošlo k internalizaci. K internalizaci došlo až po odštěpení EGF pomocí metaloproteináz (k tomuto zjištění sloužily kontrolní vektory, u kterých nebyly EGF připojeny sekvencí štěpitelnou pomocí metaloproteináz). Pracovníci z toho vyvodili, že EGF stéricky brání internalizaci. Pravděpodobně lze stejně jako tyto vektory modifikovat i jiné virové nanočástice.

VLPs, nebo obecně VNPs, mohou být tedy specificky cílené k nádorovým buňkám prostřednictvím ligandů jako například receptoru kyseliny listové nebo adenovirového ligandu integrinu. Takové ligandy mohou být asociovány s VNPs chemicky nebo genetickou insercí. Takovéto VNPs mohou nést toxiny, siRNA nebo látky sloužící diagnosticky. VNPs mohou na svém povrchu nést peptid exprimovaný buňkami nádoru a pomáhat tak při prezentaci tohoto antigenu imunitnímu systému.

3.2 Odlišné pH

V blízkém prostředí nádoru bývá pH často snižené, především kvůli lokálnímu anoxygennímu metabolismu. Snižování pH nádorové tkáně oproti zdravé tkáni je jev známý jako Warburgův efekt (Vander Heiden, 2009) a tento rozdíl pH může být v řádu desetin jednotek (Gerweck a Seetharaman, 1996) nebo i o celou jednotku pH (Zhu a Torchilin, 2013).

Pracovníky výzkumného týmu Ohtake *et al.*, (2010) byla sestavena pH senzitivní VLP odvozená od lidského polyomaviru JC. V této práci byl na vnitřní stěnu VLP připojen hexahistidinový peptid fúzí s minoritním kapsidovým proteinem (VP2). V dalším kroku asocioval s JC Nitritotriacetát-sulforhodamin vazbou na imidazolovou skupinu histidinu. Sulforhodaminová skupina mající fluorescenční aktivitu byla po endocytóze buňkami fibroblastové linie detekována separátně od virových kapsid JC VLP, které byly označené zeleným fluorescenčním proteinem (GFP, green fluorescent protein), což indikovalo, že došlo k uvolnění sulforhodamidu z VLP v důsledku protonizace vloženého peptidu v prostředí nižšího pH uvnitř buňky. Po změně pH po endocytóze došlo k protonaci histidinů (hexahistidinový peptid měl pKa kolem 6,5), disociaci vázané molekuly a jejímu

průniku 1 nm póry v kapsidě VLP. Výzkum Ohtake *et al.*, (2010) poukazuje na možnost sestavení VLP systémů schopných disociace dopravované látky po vstupu do buňky. Tuto studii lze brát také jako krok ve vývoji pH senzitivních VLP nosičů medikamentů, například i do oblastí pH sníženého vlivem nádorového bujení.

3.3 Odlišná Teplota

Potenciál metod založených na termolabilních VNPs není dnes dobře prozkoumán. Teoreticky se tyto metody jeví obtížně aplikovatelné, jelikož relativní rozdíl teploty mezi nádorovou a zdravou tkání je příliš malý. Ačkoli již byly vyvinuty nádorově specifické termosenzitivní liposomy (Torchilin, 2009), mechanismus této specificity (rozdílná propustnost fosfolipidové dvojvrstvy) není obecně extrapolovatelný na VNPs.

Nicméně první kroky ve výzkumu termosenzitivních VLPs již byly podniknuty v rámci výzkumu Musick *et al.*, (2011). Tato výzkumná skupina sestrojila chimérickou VLP odvozenou od adeno asociovaného viru 2 (AAV₂, adeno associated virus 2). kapsidové proteiny VP1 těchto VLPs byly nahrazeny doménami, které jsou schopné vázat nikl. Při zahřátí na teploty nad 60 C° došlo k změnám konformace kapsidy a externalizaci inkorporovaných domén, které navázaly nikl. Samozřejmě reakce VLP na tak vysoké teploty nejsou vhodné pro klinické použití při dopravě terapeutických substancí a další výzkum tímto směrem by tedy patrně směřoval k vývoji VLPs senzitivních k teplotám bližším fyziologické teplotě organismu. Případně může dojít k uplatnění termosenzitivních VLPs v jiné oblasti.

3.4 Mechanismus uvolnění terapeutika

Doprava hydrofobních léčiv do cílových buněk prostřednictvím VLPs bez použití konjugace léčiva k VLP může být obtížná.

Zajímavá strategie uvolnění léčiva z VLP byla využita v práci Niikura *et al.*, (2013b). Studií této výzkumné skupiny byla ověřena možnost uvolnění dopravovaného protinádorového léčiva vlivem změny redoxního potenciálu. Niikura *et al.*, (2013b) modifikovali VLP odvozené od JC polyomaviru cyklodextrinem tvořícím hydrofobní kapsu pro paxitaxel, nebo fluorescenční barvu. Cyklodextrin byl konjugován s thiosulfátovou skupinou, ta interagovala s interními cysteinovými zbytky kapsidy disulfidovou vazbou. Takovéto VLPs byly aplikovány na buňky tkáňové kultury fibroblastů a

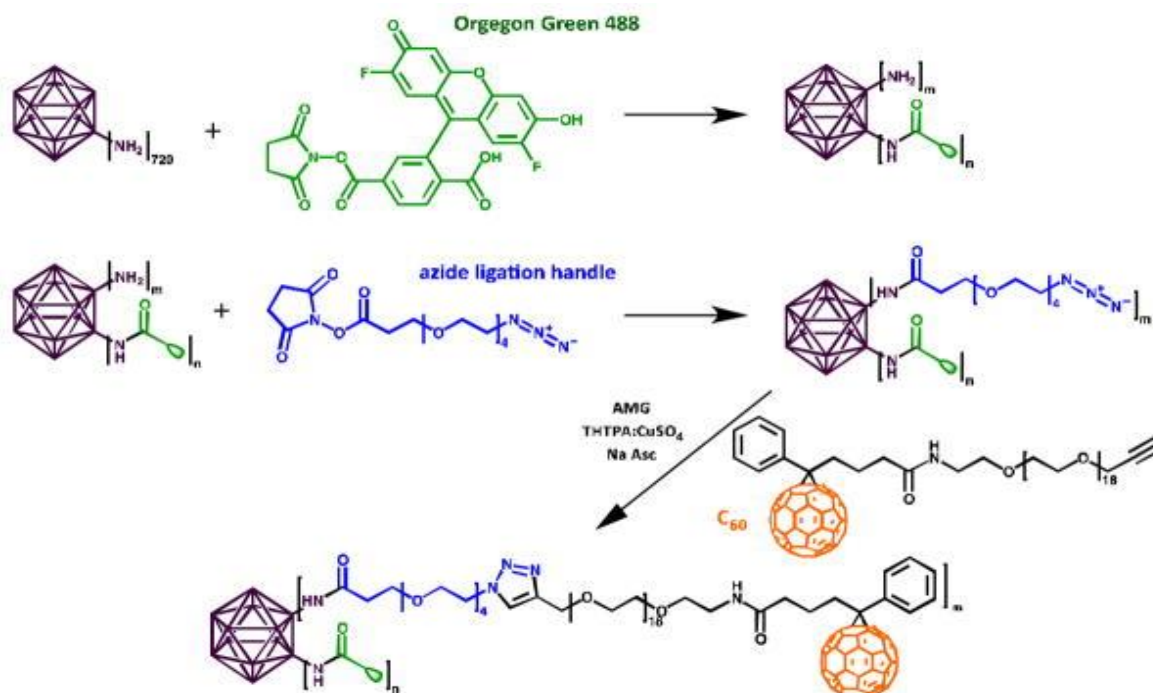
po proniknutí do buněk byly disulfidové vazby štěpeny buněčnými redukujícími enzymy. S rostoucí koncentrací paxitaxelu klesal podíl přeživších buněk fibroblastové kultury nejstrměji pro paxitaxel ve formě VLP-cykloextrin-paxitaxelu v porovnání s volným paxitaxelem nebo cykloextrin-paxitaxelem. Pro VLP nesoucí fluorescenční barvu v cykloextrinovém pouzdře bylo dosaženo znatelně vyššího fluorescenčního signálu buněk v porovnání se samotným cykloextrinem nesoucím barvu (30-ti násobku po 3 hodinách inkubace).

3.5 Fotodynamická likvidace nádorových buněk

Fullereny díky konjugovanému systému π orbitalů snadno absorbují viditelné světlo (Mroz *et al.*, 2007). Následnou excitací se v biologických systémech za přítomnosti kyslíku generují kyslíkové radikály, především za účasti NAD(P)H. Díky této fotoreaktivitě byly brzy shledány jako vhodné nástroje pro léčbu nádorů (Yamakoshi *et al.*, 1999).

V rámci práce Wen *et al.*, (2012b) byla chemicky spojena VNP s C 60 fullerenovými sférickými oligomery. Tato konjugace odstranila omezení aplikace fullerenů v biologických systémech způsobené jejich nerozpustností v polárních roztocích. Použity byly kapsidy bakteriofága Q β a VNPs byly konjugované s fullerenem pomocí PEG linkeru. Konjugace fullerennových sfér nezpůsobila inhibici internalizace rakovinnými buňkami. 70% buněk z kultury karcinomu prostaty po aplikaci těchto Q β -VNPs zemřelo.

Fotodynamická destrukce může být způsobená i jinými molekulami, například porfyrinem s centrálním zinkem (Rhee *et al.*, 2012). Ve studii Rhee *et al.* byla použita Q β VLP a ligand zajišťující vazbu k buňkám tkáňové kultury byl cukerné povahy.



Obr. 4. Schéma konjugace Q β k fullerenu

Lysinové zbytky Q β modifikované fluorescenční barvou pro účely vyhodnocení experimentu (zeleně) byly konjugovány NHS reakcí s PEG linkerem zakončeným azidovou skupinou. Prostřednictvím azidové skupiny pak došlo ke spojení s fullerén-PEG molekulou opatřenou terminální alkylovou skupinou CuAAC reakcí. Převzato z Wen et al., (2012b).

4. Využití virových nanočástic diagnosticky

Využití od virů odvozených nanočástic k diagnostickým účelům, tj. k vizualizaci cílových struktur, se v zásadě neliší od jejich využití k dopravě terapeutik. Dochází ke specifické asociaci nanočástic s cílovou buňkou. Takové VNPs či VLPs mohou být opatřeny molekulami sloužícími k zvýraznění buňky. Diagnostických technik založených na virových nanočásticích se dá využít jednak v lékařství a jednak ve vědeckém výzkumu, například právě ve výzkumu biodistribuce virů.

4.1 Fluorescence

Fluorescence je jedna ze základních vizualizačních metod ve vědeckém výzkumu a například některé studie z předchozí kapitoly ji využily k detekci interakce VLP s buňkou.

Již dříve se používaly fluorofory k výzkumu interakcí dvou membrán, typicky membrány obaleného viru a hostitelské buňky. Kupříkladu jedna z metod měření kinetiky fúze obou membrán byla založena na zesilování fluorescenčního signálu v oblastech fúze membrán. V takovém případě měla jedna z membrán inkorporované fluorescenční sondy (chlorid octadekyl rhodamin B). V oblastech fúze obou membrán docházelo ke snížení místní koncentrace sondy. Fluorescenční signál této sondy vyhasíná při vysokých lokálních koncentracích této sondy a při snížení lokálních koncentrací se opět reaktivuje (Hoekstra *et al.*, 1984).

Další metoda, která využívala VNP diagnosticky byla založena na biarsenických fluoroforech, které váží tetracysteinový motiv-CCxxCC. Takový motiv je možno do viru či VNP inkorporovat geneticky. Tyto fluorofory jsou pak aktivní pouze vázané a dají se dobře používat k mapování interakcí virů s hostitelem (Das *et al.*, 2009).

Jako příklad výzkumu, při kterém bylo použito konjugace fluorescenční molekuly s VNP může sloužit výzkum Lewis *et al.*, (2006). Pracovníky této výzkumné skupiny byly CPMV VNPs chemicky konjugované NHS reakcí s fluorescenčními barvami. VNPs v této studii nebyly obohaceny žádnými molekulami určujícími specifitu, avšak kvůli své přirozené afinitě k vimentinu byl oběhový systém pokusného zvířete, kterému byly nitrožilně podané takovéto VNPs, fluorescenčně vizualizován. Asociace VNPs s PEGem znemožnila přímo internalizaci endoteliálními buňkami. Myši podrobené této metodě nevykazovaly žádné zdravotní komplikace. Připojení je možné také geneticky, fúzí proteinu VNP například s GFP (Ohtake *et al.*, 2007), za předpokladu, že VNP obsahující fúzní variantu bude stabilní.

Pro jistou kombinaci výhod VLPs a anorganických QDs (quantum dots-“kvantové tečky”, fluorescenční nanokrystaly) se rozhodli výzkumníci týmu, který provedl enkapsidaci CdSe/ZnS kvantových teček v SV40 VLP (SV40 z angl. simian virus 40) mechanismem *in vitro* složení VLP v prostředí QDs. Tímto došlo jen k mírnému posunu emisního spektra enkapsidovaných QDs oproti volným. QD-VLPs pronikaly do buněk tkáňové kultury lépe než samotné QDs (Li *et al.*, 2009).

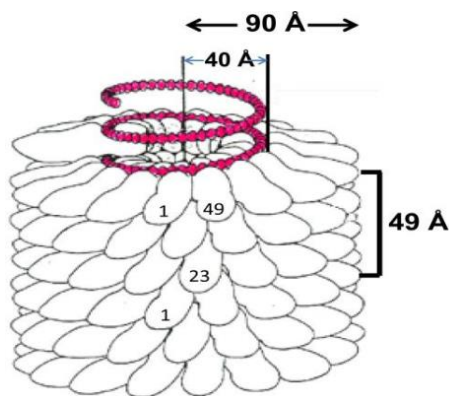
Enkapsidované QDs po fotoaktivaci produkují spíše peroxid vodíku místo agresivních hydroxylových radikálů produkovaných volnými anorganickými QD krystaly, což je pro medicínské použití výhodné (Rajendran *et al.*, 2010).

QDs mohou být také na VNP navázány prostřednictvím specifických QD vazebných peptidů. Lee *et al.*, (2002) vytvořili vrstvu ZnS QD na povrchu bakteriofága M13 (obr. 6) s geneticky inzertovaným peptidem vykazujícím afinitu k Zn/S. Monodisperzita byla udržována magnetickým polem a výsledná struktura závisela na koncentraci roztoku ZnS, kterému byly VNPs vystaveny. Na virovém templátu došlo ke krystalizaci QDs za vzniku hybridního filmu.

4.2 Magnetická rezonance

Zobrazování magnetickou rezonancí (z angl. MRI, magnetic resonance imaging) je zobrazovací metoda založená na ovlivňování nukleonů magnetickým polem a následném měření napětí indukovaného při relaxaci magnetického pole.

Výzkumný tým Bruckman *et al.*, (2013) konjugoval virus tabákové mozaiky (TMV, tobacco mosaic virus, obr. 4.) s chelatační látkou, prostřednictvím které byl TMV asociován s gadoliniem (Gd). Gd se používá jako kontrastní látka při MRI. Vazba Gd na nanočástici i efekt koncentrace více iontů připadající na jednu nanočástici zvýšily kontrastní schopnost prodloužením relaxačních dob. Kromě toho výzkumníci zjistili, že TMV částice, které mohou prodělat termální přechod do sférické formy (Atabekov a kol. 2011), jsou ve své sférické formě schopné dále zvýšit relaxační dobu asociovaných Gd.



Obr. 5. Struktura TMV

Základní kapsidový protein TMV nukleuje kolem vlákna RNA do helikální struktury 300 nm x 18 nm s úzkým centrálním kanálem (Namba kol. 1989).

Další příklad syntézy od virů odvozených MRI kontrastních částic je práce, v rámci které byla připravena VLP odvozená od geneticky modifikovaného bakteriofága P22 (obr. 7.) obsahující geneticky vložený vnitřně orientovaný cysteinový zbytek. Originální interiorní cysteinový zbytek totiž není pro tyto účely použitelný, jelikož se v kapsidě nachází v oblasti nepřístupné modifikacím (Kang *et al.*, 2010). Přes příslušnou thiolovou skupinu byla kapsida konjugována s iniciátorem polymerizační reakce pomocí Cu/bipyridinové katalýzy. Iniciátorová molekula pak zprostředkovala polymerizaci 2-aminoethylmethakrylátu uvnitř kapsidy. Ve vnitřku uložený polymer pak sloužil jako tzv. "scaffold"-lešení k lepší asociaci molekul obsahujících gadolinium (Lucon *et al.*, 2012).

4.3 Pozitronová emisní tomografie

Pozitronová emisní tomografie (PET) je zobrazovací metoda založená na detekci fotonů vzniklých při anihilaci pozitronů vyzářených z radioaktivní látky. Virovou kapsidu je možné konjugovat s molekulou obsahující radioaktivní izotopy pro PET. Konjugovaná radioaktivní molekula pak vydrží v oběhu déle než volná molekula, jak ukazuje například výzkum s MS2 fágem konjugovaným interionně s radioaktivním fluorbenzaldehydem (Hooker *et al.*, 2008).

Konjugace emitující substance s VLP pochopitelně umožňuje cílování na konkrétní tkáň prostřednictvím zmíněných modifikací kapsidy. Konjugací lze také omezit renální filtraci. Asociace několika emitujících substancí na jedné VLP multivalentní ligací také zlepšuje signál.

5. Virové nanočástice jako mikrobicidní a antivirové prostředky

Využití od virů odvozených částic pro boj s virovými nebo bakteriálními onemocněními jinak než očkováním a onkolytickou léčbou je přístup v dnešní době relativně málo zkoumáný, ale i pro tento přístup již existují reprezentativní příklady výzkumů.

5.1 Virové nanočástice jako prostředky pro boj s virovými onemocněními

Cílování buněk napadených viry pomocí VLPs je technika principiálně velmi příbuzná technice cílování nádorových buněk. VLPs či obecně VNPs nesoucí terapeutickou látku musí rozpoznat napadenou buňku a asociovat s ní.

Příklad výzkumu zabývajícího se použitím VLPs pro boj s virovými onemocněními je výzkum Lin *et al.*, (2014). Tato výzkumná skupina použila JC polyomavirové VLPs vnášející do buněk napadených viry shRNA (z angl. small hairpin RNA), která je komplementární k mRNA pro LT antigen (z angl. large T antigen), jenž je důležitý pro replikaci patogenního BK polyomaviru. Oba viry BK i JC jsou si příbuzné a oba vykazují přirozeně tropismus k tkáni ledvin. VLPs odvozené od JC-polyomaviru byly použity k léčbě tkáňové kulury lidských ledvinných buněk napadených BK poly-

omavirem pomocí fenoménu RNA interference vyvolané dotyčnou shRNA. Redukce buněk exprimujících BK antigeny byla přibližně 80%.

5.2 Virové nanočástice jako nosiče bakteriocidních látek

Jako v případě fotodynamické léčby nádorů bylo uhynutí buněk i ve výzkumu Suci *et al.*, (2007), který se věnoval využití VLPs pro bakteriocidní účely, způsobeno tvorbou radikálů. V tomto výzkumu byl virus chlorotické mozaiky vigny (CCMV, cowpea chlorotic mottle virus) geneticky upravený cysteinem, který pak umožňoval kovalentní spojení s fotoaktivní látkou, bis(2,2-bipyridin)iodoacetoamino-1,10-fenantrolinrutheniem. Cílování patogenu bylo zajištěno přes modulární složky. Biotinová skupina byla navázána na postranní řetězec lysinu VLP, jiný biotin byl konjugovaný také s protilátkou proti antigenu bakterie *Streptococcus aureus* a vazba obou biotinů byla zprostředkována streptavidinem. Úbytek živých *S. aureus* byl signifikantní v porovnání s bakteriemi vystavenými samotné fotoaktivní látce nebo bakteriemi vystavenými necílované VLP konjugované s fotoaktivní látkou.

6. Chimérické virové nanočástice jako antitoxiny

Kromě léčby nádorových, virových a bakteriálních onemocnění je léčba onemocnění způsobených toxiny další myslitelnou oblastí, kde lze uplatnit VNPs.

Jedna z mála prací věnující se tomuto uplatnění VNPs je práce Manayani *et al.*, (2007) zabývající se chimérickými VWA-FHV VLP nanočásticemi (FHV z angl. flock house virus). Pracovníky této výzkumné skupiny byla část kapsidové podjednotky FHV nahrazena doménou VWA (z angl. von Willebrand factor A) z receptoru toxinu anthraxu 2 (ANTHR2, anthrax toxin receptor 2), která váže PA (z angl. protective antigen) doménu patřící toxinu anthraxu. K autoorganizaci VLPs došlo na základě náhodných buněčných RNAs. Takové VLPs pak kompetitivní inhibicí ochránily pokusné hlodavce před smrtelnou dávkou toxinu (obr.6.), aniž jim způsobily pozorovatelné komplikace. Navíc vyrobené VLPs asociované s PA doménou přes zmíněný geneticky fúzovaný receptor fungovaly jako nosiče antigenu pro vakcinaci proti anthraxu a myši imuzované těmito VLPs si

uchovaly rezistenci vůči anthraxu i několik týdnů po podání VLPs. Podobným způsobem je teoreticky možné sestavit multivalentní kompetitivní inhibitory jakýchkoli toxických látek.

Groups	Molar Ratio of VWA _{ANTXR2} : PA	Survivors/ Total	Average TTD ± SD (min)
PBS	NA	3/3	NA
LeTx	NA	0/5	69.2 ± 1.5
FHV wt + LeTx	NA	0/3	67.7 ± 5.1
sANTXR2 + LeTx	2:1	5/5	NA
sANTXR2 + LeTx	0.2:1	0/5	77 ± 4.6
FHV-VWA _{ANTXR2} 264 + LeTx	2:1	5/5	NA
FHV-VWA _{ANTXR2} 264+ LeTx	0.2:1	0/5	89.4 ± 5.4

Obr. 6., tabulka popisuje přípravky, které byly dány pokusným zvířatům, koncentraci přípravků, poměr přeživších zvířat a prodlevu před smrtí.

LeTx-toxin anthraxu, ANTXR2-receptor toxinu anthraxu, FHV-VWA ANTXR2 264-modifikovaná VLP (viz text). TTD-doba dožití (převzato z Manayani et al., 2007).

7. Virové nanočástice pro ovlivnění endogenních molekul

Podobně jako v případě neutralizace toxinů pomocí VNPs lze postupovat i v případě, když je cílem výzkumníků modulační bioaktivity různých endogenně se vyskytujících látek. Alternativní možností je využití VNPs jako nosičů antigenů nežádoucích endogenních molekul k vyvolání imunitní odpovědi proti nim. VNPs také mohou nést malé interferující RNA k modulaci exprese proteinů.

7.1 Virové nanočástice jako koagulans

Příklad výzkumu ve kterém sloužily VLPs jako nosiče molekul neutralizující cílovou endogenní látku, je výzkum Udit *et al.*, (2009). Pracovníci této výzkumné skupiny sestavili VLP konstrukt odvozený od Q β , který měl bodovými mutacemi některé povrchové aminokyseliny nahrazené argininem. Taková VLP pak měla schopnost in vitro inhibice lidského heparinu interakcí s jeho zá-

porně nabitými sulfátovými zbytky. V této studii se také ukázalo, že jisté bodové mutace nebyly kompatibilní se stabilní nanočásticí. K dalšímu zvýšení celkového kladného náboje bylo proto využito chemických konjugací. Vazbou těchto nanočástic na heparin pak došlo k inhibici heparinu až o 95%, a tedy k zvýšení srážlivosti krve.

7.2 Virové nanočástice pro léčbu aterosklerózy

Imunizace je možná nejen proti patogenům či nádorovým buňkám, ale i proti epitopům tělu vlastním, čehož bylo využito například ve výzkumu Tissot *et al.*, (2013). Tato skupina vycházela z předpokladu, že IL-1 (interleukin 1) se podílí signifikantně na vzniku aterosklerotických plátů. Tissot *et al.* spojili maleimidovou reakcí VLP Q β s myším IL-1. Po několikanásobném podání takovýchto VLPs apolipoprotein E defektní myši došlo ke snížení tvorby aterosklerotických plátů (oproti kontrolní skupině zvířat až o 50%). Apolipoprotein E deficientní myši jsou modelem ve studiích, které se zabývají léčbou aterosklerózy, jelikož v nich spontánně vznikají aterosklerotické defekty. Je nutno zmínit, že ačkoli byly výsledky signifikantní, IL-1 je velmi důležitý multifunkční protein a změna jeho hladiny v organismu vlivem působení protilátek může mít vážné vedlejší účinky.

7.3 Virové nanočástice pro léčbu obezity

Jedním z civilizačních problémů je obezita vedoucí k chronickým zdravotním komplikacím. Výzkumná skupina Fulurija *et al.*, (2008) se pokusili pomocí VLPs navodit autoprotilátky proti polytropnímu žaludečnímu hormonu, proti žaludečnímu inhibičnímu peptidu (GIP, gastric inhibitory peptide), který mimo jiné ovlivňuje ukládání tuků a cukrů v těle. Hlodavci imunizovaní Q β -GIP VLPs, VLPs odvozenými od Q β a nesoucími chemicky konjugovaný GIP, získali v porovnání s neimunizovanými za čtyři měsíce po přechodu k dietě s vysokým obsahem tuku o 35% méně váhy. Pokusná zvířata nevykazovala pozorovatelné komplikace. Rovněž metabolismus cukrů a tuků nebyl pro takto imunizovaná zvířata shledán anomální. Vakcinace alternovala rychlost klidového metabolismu a depozici tuků, ne však množství přijímané potravy. Jakkoliv může být indukce protilátek proti endogenním proteinům prospěšná v léčbě chronických onemocnění, nese s sebou jednak riziko destruktivní imunitní reakce a jednak riziko disregulace určitých signálních drah, je-li peptid

signální molekulou. Z těchto důvodů je třeba k podobným metodám přistupovat s rozvahou a bezpečnost každé takovéto konkrétní metody musí být důkladně prověřena.

7.4 Virové nanočástice pro léčbu autoimunitních onemocnění

Kromě indukce antigenně specifické imunitní odpovědi je pomocí VLPs také možné modulovat proteom prostřednictvím interferujících RNAs. V práci Pan *et al.*, (2012) zabývající se léčbou autoimunitního onemocnění pomocí VLPs odvozených od fága MS2 došlo ke konjugaci VLP s transaktivačním regulačním proteinem (Tat, transactivating regulatory protein), penetračním peptidem odvozeným od viru lidské imunodeficiency (HIV-human immunodeficiency virus). Tento peptid umožňuje proniknutí do buněk, jak bylo dokázáno dříve (Brooks *et. al.*, 2005). MS2-Tat VLPs pak byly použity jako vehikly dopravující do myšího modelu miRNA146a, která negativně reguluje mRNA, jejíž produkty jsou důležité pro regulaci imunitní odpovědi. Myší model, myši linie BXSB, trpí v důsledku chromozomové přestavby těžkým autoimunitním onemocněním, formou lupus erythematosus (<http://jaxmice.jax.org/strain/000740.html>, 12.8. 2014). Těmto myším se po podání takovýchto VLPs snížil celkový počet anti dsDNA protilátek zhruba na třetinu a také došlo ke snížení počtu prozánětlivých cytokinů

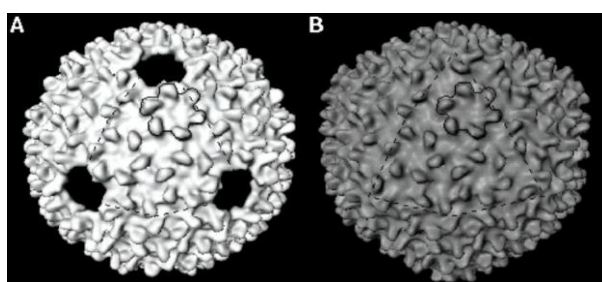
8. Virové nanočástice jako nanoreaktory

VLPs jsou proteinové klece a jako takové mohou ovlivňovat parametry enzymů umístěných v jejich vnitřku, jak je popsáno u následujících příkladů.

Patterson *et al.*, (2012) zjistili změnu kinetických parametrů alkoholdehydrogenáz umístěných v kapsidě bakteriofága P22 oproti volným alkoholdehydrogenázám. Enzym byl připojen genetickou fúzí ke strukturnímu scaffold proteinu, kterých se v jedné kapsidě bakteriofága P22 nachází 100-330. Tím byla zajištěna vysoká lokální koncentrace enzymu. Substrát vstupoval k enzymu póry, které vznikají při umělé termální maturaci kapsidy P22 popsané již dříve (Teschke a kol 2003). Ačkoliv byla katalytická aktivita takto enkapsidovaných enzymů snížena, došlo i k snížení inhibice substrátem oproti volnému enzymu.

Také výzkumnou skupinou Fiedler *et al.*, (2010) bylo pro systémy Q β VLP a luciferázy nebo peptidázy zaznamenáno vesměs snížení efektivity enzymů vlivem umístění ve vnitřku VLP. Enkapsidované enzymy ale nebyly inhibované adsorbci a zvýšením teploty, peptidáza v kapsidě byla také odolnější proti proteolytickému štěpení. V této studii byly enzymy s VLP asociované pomocí RNA aptamerů, krátkých sekvencí RNA, které vážou cílovou molekulu. Na každou VLP částici připadalo 2-18 molekul peptidázy, nebo 4-8 molekul luciferázy.

Ačkoliv takovéto zajímavé možnosti VLPs spíše inklinují k průmyslovým či biotechnologickým použitím, mohou se v budoucnu objevit i medicínské aplikace takovýchto nanoreaktorů.



Obr. 7., Model kapsidy P22 a model termálně maturované kapsidy P22.

P22 má ikosahedrální kapsidu o průměru 60 nm a triangulaci $T=7$. A-termálně expandovaná kapsida. B-kapsida maturovaná *in vitro* (převzato z Teschke a kol. 2003).

9. Virové nanočástice pro extrakci rekombinantních proteinů

Proteinové produkty heterologních expresních systémů někdy z části tvoří nerozpustné agregáty zvané inkluzní tělíska a jeden ze způsobů jejich solubilizace může využívat VLPs.

Patterson *et al.*, (2013) zkonstruovali rekombinantní proteiny zájmu fúzované se scaffold proteinem fága P22. Rekombinantní proteiny byly koexprimované s kapsidovým proteinem P22, čímž došlo ke složení VLP naplněné proteiny zájmu, chřipkovým hemagglutininem, nebo termostabilní galaktosidázou. Galaktosidázy enkapsidované ve VLP vykazovaly zvýšenou aktivitu oproti volným enzymům, z čehož autoři odvodili, že enkapsidací dochází k produkci většího podílu proteinů v nativní konformaci. Autoři také prověřili možnost uvolnění proteinů pH indukovanou disociací kapsidy, ale hodnoty pH, při kterých disociovala kapsida, způsobily precipitaci všech proteinů. Takto sekvestrované proteiny lze teoreticky uvolnit, je-li scaffold protein s proteinem zájmu spojen například pH-labilní vazbou. Taková vazba by umožnila disociaci proteinů zájmu od VLPs při hod-

notách pH, které by nezpůsobily denaturaci proteinů. Tato možnost ale experimentálně zatím prověřena nebyla.

10. Virové nanočástice jako templáty kovových nanočástic

Kovové nanočástice sdílejí s VNPs některá použití v odvětvích biomedicíny. V jiných oblastech se ale VNPs jako alternativa kovových nanočástic použít nedají, například v informačních technologiích nebo použití nanočástic jako nanokatalyzátorů (Feldheim a Foss, 2002). Ve všech oblastech aplikací kovových nanočástic ale mohou VNPs sloužit jako templát, na kterém jsou příslušné kovové nanočástice syntetizovány.

Syntéza kovových nanočástic vyžaduje stabilní templáty, jakými jsou například TMV nebo CPMV (Stubbs, 1990; Lin *et al.*, 1999). Ve výzkumu Aljabali *et al.*, (2010) sloužily exteriorní lysinové zbytky CPMV kapsidy jako nukleační body redukce kovových iontů elektrickým proudem. Vznikl kovový "plášť" niklu, železa, paládia, kobaltu, nebo sloučenin těchto kovů jako NiFe, kterým byl pokryt povrch CPMV VNP.

Jinou možností efektivního pokovení VNP je zvýšení celkového záporného náboje VNP chemickou manipulací postranních zbytků aminokyselin. Zvýšení celkového záporného náboje může být provedeno například chemickou modifikací postranních lysinových zbytků, při níž je odstíněn jejich kladný náboj. Na takovýchto VNPs se pak mohou redukovat kovové kationty (Aljabali a Evans, 2014).

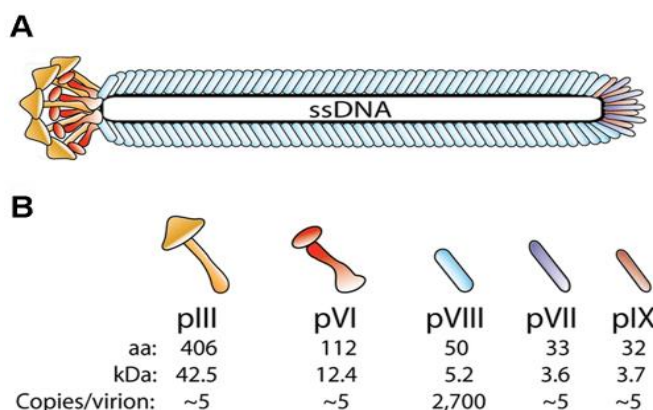
Další naskytující se možnost je přímo modifikovat kapsidu inzercí aminokyselin se záporně nabitým postranním zbytkem. Tak učinili například Ghosh *et al.*, (2010) s M13 VNPs, které byly následně pokovené oxidy železa a modifikované rakovinně specifickým peptidem. Takto upravené VNPs byly poté použity jako kontrastní agens k magnetické rezonanci.

TMVs mohou být inkorporované kovovými nanočásticemi i bez předchozích modifikací, jak ukázali Khan *et al.*, (2013), kteří asociovali nanočástice zlata s citrátem, nanočástice pak agregovaly s TMVs za sníženého pH, které protonací kapsidy redukovalo její záporný náboj.

11. Virové nanočástice pro výrobu elektrických článků

Kovové nanočástice vzniklé syntézou na VNPs mohou sloužit jako elektrické nanočlánky. Ačkoliv je užití elektrických nanočlánků pro medicínské účely v současné době méně zřejmé, v oblastech nanotechnologií může být tento produkt výzkumu aplikace VNPs zásadní.

Nam *et al.*, (2006) provedli fúzi N konce pVIII, hlavního kapsidového proteinu fága M13 (Obr. 6.), s tetraglutamátovým peptidem. Na tetraglutamátovém peptidu se potom elektrostaticky navázal oxid kobaltu, Co_3O_4 , a došlo k mineralizaci VNPs a tvorbě denzních nanovláken. Elektrický článek složený z katody vyrobené z těchto nanovláken v přítomnosti iontů lithia jako elektrolytu převyšoval svojí kapacitou asi dvakrát dnes používané uhlíkové baterie. V dalším kroku byla s pVIII proteiny bakteriofága M13 fúzována aminokyselinová sekvence (LKAHLPPSRPS) vážící zlaté nanočástice. Obě varianty mutovaného proteinu tvořily dohromady hybridní strukturu (obr.7.). Takovýto hybridní článek měl svoji kapacitu oproti článku jen z Cu_3O_4 vazebných pVIII dále zvýšenou.

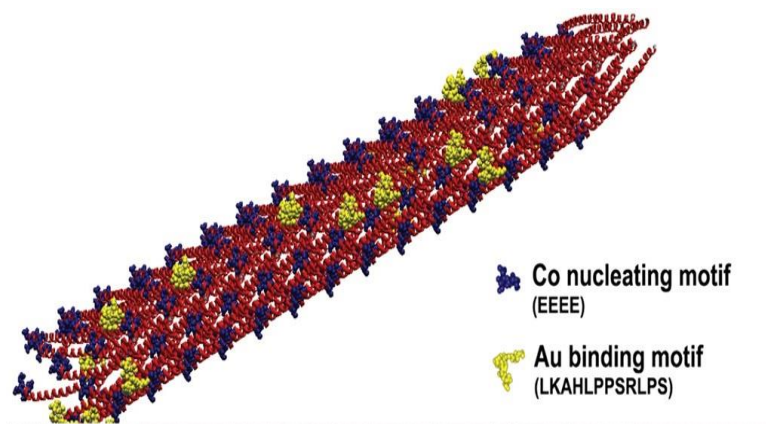


Obr. 8. Schematické znázornění struktury bakteriofága M13 (A) a jeho proteinů (B)

M13 je bakteriofág s vláknitou kapsidou s průměrem 6,5 nm a délkou 930 nm. Kapsida je složena z šesti proteinů (převzato z Glucksman *et al.*, 1992). Nestandardní tvar fága M13 umožňuje asociaci do vláken.

Obr. 9. struktura elektrického nanočlánku

Co_3O_4 vazebný motiv je znázorněn modře, Au vazebný motiv žlutě (převzato z Nam *et al.*, 2006).



K další optimalizaci vývoje těchto nanočlánků dospěli Royston *et al.*, (2008). Tato výzkumná skupina provedla inzerci cysteinového zbytku do kapsidy TMV, thiolová skupina takového VNP pak interagovala se zlatou ploškou. Z TMVs takto přichycených k podkladu byl následně mineralizací niklem a kobaltem vytvořen nanočlánek. Nanočlánky vytvořené organizací takto upravených VNPs uspořádaných na zlatém povrchu pak vykazovaly oproti nanočlánkům z nemutovaných TMVs (tedy z TMVs neuspořádaných na zlaté plošce pomocí inzertovaného cysteinu) až dvojnásobnou kapacitu.

12. Závěr

Virové nanočástice lze kromě tradiční vakcinace a pro účely genové terapie využít k eliminaci nádorů, viry infikovaných buněk, bakteriálních patogenů, toxinů nebo nežádoucích endogenních látek. Principiálně VNPs takto použité nesou toxin, interferující RNA, fotoaktivní molekulu pro produkci kyslíkových radikálů nebo antigen pro navození protilátkové imunitní reakce. VNPs takto použité jsou často toxické a omezení jejich interakce se zdravou tkání je klíčové pro přechod ke klinické praxi. V oblasti vědeckého výzkumu a v klinické diagnostice se VNPs mohou rovněž uplatnit, a to jako nosiče diagnostických molekul nebo kontrastních materiálů. VLPs mohou enkapsidovat bioaktivní molekulu a tím ovlivňovat některé její parametry. Toto může být přínosné například v případech, kdy bude žádoucí omezení inhibice enzymu. Možná se v budoucnu pomocí enkapsidace VLPs podaří i efektivně zvyšovat podíl rozpustné složky heterologně exprimovaných proteinů. Již dnes se virové nanočástice používají k syntéze monodisperzních materiálů pro nanotechnologie, což je jen krok od produkce nanobaterií založených na virových templátech. Prototypy takových baterií již byly sestaveny a svými parametry se zdají slibné. Výzkum zmíněných metod pokročil různě daleko. V případě medicínských aplikací pokročil nejdále k testování na zvířecích

subjektech. Cíle, které jsou sledovány studiemi VNPs asi nejčastěji, jsou léčba nádorů, užití VNPs jako nosičů diagnostických látek a templátů pro syntézu kovových nanočástic. Práce zabývající se jinými uplatněními bývají často ojedinělé. Lze předpokládat, že vzhledem k rostoucímu zájmu o biotechnologie a nanotechnologie budou VLPs nebo obecněji VNPs stále více objektem zájmu výzkumných skupin a následně nástrojem medicínských, nanotechnologických a i jiných aplikací.

13. Reference

- Agarwal R, Singh V, Journey P, Shi L, Sreenivasan SV, Roy K. 2013. Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(43):17247-52.
- Albanese A, Tang PS, Chan WC. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 14:1-16.
- Aljabali AA, Barclay JE, Lomonosoff GP, Evans DJ. 2010. 2(12):2596-600. Virus templated metallic nanoparticles. *Nanoscale*.
- Aljabali AA, Evans DJ. 2014. Templated mineralization by charge-modified cowpea mosaic virus. *Methods Mol Biol*. 1108:89-95.
- Ashley CE, Carnes EC, Phillips GK, Durfee PN, Buley MD, Lino CA, Padilla DP, Phillips B, Carter MB, Willman CL, Brinker CJ, Caldeira Jdo C, Chackerian B, Wharton W, Peabody DS. 2011. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*. 5(7):5729-45.
- Atabekov J, Nikitin N, Arkhipenko M, Chirkov S, Karpova O. 2011. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. *J Gen Virol*. 92(Pt 2):453-6.
- Avalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. 2014. Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int Wound J*. [Epub ahead of print].
- Bai M, Harfe B, Freimuth P. 1993. Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J Virol*. 67(9):5198-205.
- Bhattacharjee S, Ershov D, Fytianos K, van der Gucht J, Alink GM, Rietjens IM, Marcelis AT, Zuilhof H. 2012. Cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with different size and surface characteristics. *Part Fibre Toxicol*. 9:11.
- Brooks H, Lebleu B, Vivès E. 2005. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev*. 57(4):559-77.
- Bruckman MA, Hern S, Jiang K, Flask CA, Yu X, Steinmetz NF. 2013. Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 1(10):1482-1490.
- Campadelli-Fiume G, Avitabile E, Fini S, Stirpe D, Arsenakis M, Roizman B. 1988. Herpes simplex virus glycoprotein D is sufficient to induce spontaneous pH-independent fusion in a cell line that constitutively expresses the glycoprotein. *Virology*. 166(2):598-602.
- Carrstensen H, Müller RH, Müller BW. 1992. Particle size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model drug carriers as parameters related to RES uptake. *Clin Nutr*. 11(5):289-97.

- Castel S, Pagan R, Mitjans F, Piulats J, Goodman S, Jonczyk A, Huber F, Vilaró S, Reina M. 2001. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of $\alpha(v)$ -integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Lab Invest.* 81(12):1615-26.
- Champion JA, Mitragotri S. 2006. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(13):4930-4.
- Champion JA, Mitragotri S. 2009. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res.* 26(1):244-9.
- Chaudhari KR, Ukawala M, Manjappa AS, Kumar A, Mundada PK, Mishra AK, Mathur R, Mönkkönen J, Murthy RS. Opsonization, biodistribution, cellular uptake and apoptosis study of PEGylated PBCA nanoparticle as potential drug delivery carrier. *Pharm Res.* 2012. 29(1):53-68.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6(4):662-8.
- Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. 2007. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 25(10):1165-70.
- Cotter MJ, Muruve DA. 2005. The induction of inflammation by adenovirus vectors used for gene therapy. *Front Biosci.* 10:1098-105.
- Das SC, Panda D, Nayak D, Pattnaik AK. 2009. Biarsenical labeling of vesicular stomatitis virus encoding tetracysteine-tagged m protein allows dynamic imaging of m protein and virus uncoating in infected cells. *J Virol.* 83(6):2611-22.
- Destito G, Yeh R, Rae CS, Finn MG, Manchester M. 2007. Folic acid-mediated targeting of cowpea mosaic virus particles to tumor cells. *Chem Biol.* 14(10):1152-62.
- Du H, Chandaroy P, Hui SW. 1997. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochim Biophys Acta.* 1326(2):236-48.
- El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, Bernstein DI, Treanor JJ, Ferreira J, Chen WH, Sublett R, Richardson C, Bargatze RF, Szein MB, Tacket CO. 2010. Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis.* 202(11):1649-58.
- Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. 2012. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv Virol.* 2012:805629.
- Fiedler JD, Brown SD, Lau JL, Finn MG. 2010. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 49(50):9648-51.
- Forstová J, Krauzewicz N, Sandig V, Elliott J, Palková Z, Strauss M, Griffin BE. 1995. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther.* 6(3):297-306.
- Fulurija A, Lutz TA, Sladko K, Osto M, Wielinga PY, Bachmann MF, Saudan P. 2008. Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS One.* 3(9):e3163.
- Gerweck LE, Seetharaman K. 1996. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* 56(6):1194-8.
- Ghosh D, Lee Y, Thomas S, Kohli AG, Yun DS, Belcher AM, Kelly KA. 2012. M13-templated magnetic nanoparticles for targeted in vivo imaging of prostate cancer. *Nat Nanotechnol.* 7(10):677-82.
- Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 11:11.
- Glucksman MJ, Bhattacharjee S, Makowski L. 1992. Three-dimensional structure of a cloning vector. X-ray diffraction studies of filamentous bacteriophage M13 at 7 Å resolution. *J Mol Biol.* 226(2):455-70.
- Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Müller RH. 2000. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG

- chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 18(3-4):301-313.
- Greish K. 2010. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol*. 2010;624:25-37.
- Hallahan D, Geng L, Qu S, Scarfone C, Giorgio T, Donnelly E, Gao X, Clanton J. 2003. Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell*. 3(1):63-74.
- Hamman JH. 2010. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs*. 8(4):1305-22.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-74.
- Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. 2007. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 353(1):26-32.
- Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. 2013. The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol Pharm Bull*. 36(6):892-9.
- Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka J, Schäffler M, Takenaka S, Möller W, Schmid G, Simon U, Kreyling WG. 2011. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm*. 77(3):407-16.
- Hoekstra D, de Boer T, Klappe K, Wilschut J. 1984. Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry*. 23(24):5675-81.
- Hooker JM, O'Neil JP, Romanini DW, Taylor SE, Francis MB. 2008. Genome-free viral capsids as carriers for positron emission tomography radiolabels. *Mol Imaging Biol*. 10(4):182-91.
- Hořejší V, Bartůňková J. 2009. *Základy imunologie*, 4. vyd. Praha. TRITON. ISBN 978-80-7387-280-9, s. 188.
- Hovlid ML, Steinmetz NF, Laufer B, Lau JL, Kuzelka J, Wang Q, Hyypiä T, Nemerow GR, Kessler H, Manchester M, Finn MG. 2012. Guiding plant virus particles to integrin-displaying cells. *Nanoscale*. 4(12):3698-705.
- Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. 2010. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*. 31(3):438-48.
- Hu X, Olivier K, Polack E, Crossman M, Zokowski K, Gronke RS, Parker S, Li Z, Nestorov I, Baker DP, Clarke J, Subramanyam M, Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. 2008. 2011. In vivo pharmacology and toxicology evaluation of polyethylene glycol-conjugated interferon beta-1a. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. 3(3):145-50. *J Pharmacol Exp Ther*. 338(3):984-96.
- Kaiser CR, Flenniken ML, Gillitzer E, Harmsen AL, Harmsen AG, Jutila MA, Douglas T, Young MJ. 2007. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2(4):715-33.
- Kang S, Uchida M, O'Neil A, Li R, Prevelige PE, Douglas T. 2010. Implementation of p22 viral capsids as nanoplatforms. *Biomacromolecules*. 11(10):2804-9.
- Karaman DS, Desai D, Senthilkumar R, Johansson EM, Rått N, Odén M, Eriksson JE, Sahlgren C, Toivola DM, Rosenholm JM. 2012. Shape engineering vs organic modification of inorganic nanoparticles as a tool for enhancing cellular internalization. *Nanoscale Res Lett*. 7(1):358.
- Khan AA, Fox EK, Górzny MŁ, Nikulina E, Brougham DF, Wege C, Bittner AM. 2013. pH control of the electrostatic binding of gold and iron oxide nanoparticles to tobacco mosaic virus. *Langmuir*. 29(7):2094-8.
- Kissmann J, Ausar SF, Foubert TR, Brock J, Switzer MH, Detzi EJ, Vedvick TS, Middaugh CR. 2008. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *J Pharm Sci*. 97(10):4208-18.
- Koudelka KJ, Destito G, Plummer EM, Trauger SA, Siuzdak G, Manchester M. 2009. Endothelial targeting of cowpea mosaic virus (CPMV) via surface vimentin. *PLoS Pathog*. 5(5):e1000417.

- Lee SW, Mao C, Flynn CE, Belcher AM. 2002. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science*. 296(5569):892-5.
- Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, Baker JR Jr, Orr BG, Holl MM. 2008. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett*. 8(2):420-4.
- Levine AJ, Ginsberg HS. 1967. Mechanism by which fiber antigen inhibits multiplication of type 5 adenovirus. *J Virol*. 1(4):747-57
- Lewis JD, Destito G, Zijlstra A, Gonzalez MJ, Quigley JP, Manchester M, Stuhlmann H. 2006. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat Med*. 12(3):354-60.
- Li F, Zhang ZP, Peng J, Cui ZQ, Pang DW, Li K, Wei HP, Zhou YF, Wen JK, Zhang XE. 2009. Imaging viral behavior in Mammalian cells with self-assembled capsid-quantum-dot hybrid particles. *Small*. 5(6):718-26.
- Lin MC, Wang M, Fang CY, Chen PL, Shen CH, Chang D. 2014. Inhibition of BK virus replication in human kidney cells by BK virus large tumor antigen-specific shRNA delivered by JC virus-like particles. *Antiviral Res*. 103:25-31.
- Lin T, Chen Z, Usha R, Stauffacher CV, Dai JB, Schmidt T, Johnson JE. 1999. The refined crystal structure of cowpea mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Virology*. 265(1):20-34.
- Lo A, Lin CT, Wu HC. 2008. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery. *Mol Cancer Ther*. 7(3):579-89
- Lucon J, Qazi S, Uchida M, Bedwell GJ, LaFrance B, Prevelige PE Jr, Douglas T. 2012. Use of the interior cavity of the P22 capsid for site-specific initiation of atom-transfer radical polymerization with high-density cargo loading. *Nat Chem*. 4(10):781-8.
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(38):14265-70.
- Manayani DJ, Thomas D, Dryden KA, Reddy V, Siladi ME, Marlett JM, Rainey GJ, Pique ME, Scobie HM, Yeager M, Young JA, Manchester M, Schneemann A. 2007. A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine. *PLoS Pathog*. 3(10):1422-31.
- Marguerite R. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci*. 30. 603–632.
- Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR. 2007. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med*. 43(5):711-9.
- Musick MA, McConnell KI, Lue JK, Wei F, Chen C, Suh J. 2011. Reprogramming virus nanoparticles to bind metal ions upon activation with heat. *Biomacromolecules*. 12(6):2153-8.
- Nam KT, Kim DW, Yoo PJ, Chiang CY, Meethong N, Hammond PT, Chiang YM, Belcher AM. 2006. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science*. 312(5775):885-8.
- Namba K, Pattanayek R, Stubbs G. 1989. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J Mol Biol*. 208(2):307-25.
- Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijio K, Sawa H. 2013a. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 7(5):3926-38.
- Niikura K, Sugimura N, Musashi Y, Mikuni S, Matsuo Y, Kobayashi S, Nagakawa K, Takahara S, Takeuchi C, Sawa H, Kinjo M, Ijio K. 2013b. Virus-like particles with removable cyclodextrins enable glutathione-triggered drug release in cells. *Mol Biosyst*. 9(3):501-7.
- Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Mikuni S, Matsuo Y, Kinjo M, Sawa H, Ijio K. 2010. Low pH-triggered model drug molecule release from virus-like particles. *ChemBiochem*. 11(7):959-62.

- Ou WC, Wang M, Fung CY, Tsai RT, Chao PC, Hseu TH, Chang D. 1999. The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J Gen Virol.* 80 (Pt 1):39-46.
- Owens DE 3rd, Peppas NA. 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 307(1):93-102.
- Pan Y, Jia T, Zhang Y, Zhang K, Zhang R, Li J, Wang L. 2012. MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice. *Int J Nanomedicine.* 7:5957-67.
- Parveen S, Sahoo SK. 2011. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur J Pharmacol.* 670(2-3):372-83.
- Patel KG, Swartz JR. 2011. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide-alkyne click chemistry. *Bioconjug Chem.* 22(3):376-87.
- Patterson DP, LaFrance B, Douglas T. 2013. Rescuing recombinant proteins by sequestration into the P22 VLP. *Chem Commun (Camb).* 49(88):10412-4.
- Patterson DP, Prevelige PE, Douglas T. 2012. Nanoreactors by programmed enzyme encapsulation inside the capsid of the bacteriophage P22. *ACS Nano.* 6(6):5000-9.
- Pellegrini G, Starkey Lewis PJ, Palmer L, Hetzel U, Goldring CE, Park BK, Kipar A, Williams DP. 2013. Intraperitoneal administration of high doses of polyethylene glycol (PEG) causes hepatic subcapsular necrosis and low-grade peritonitis with a rise in hepatic biomarkers. *Toxicology.* 314(2-3):262-6.
- Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Calabró D, Avallone B, Balsamo G. 1994. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials.* 15(15):1215-20.
- Peng KW, Morling FJ, Cosset FL, Murphy G, Russell SJ. 1997. A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases. *Hum Gene Ther.* 8(6):729-38.
- Pokorski JK, Steinmetz NF. 2011. The art of engineering viral nanoparticles. *Mol Pharm.* 8(1):29-43.
- Pouyanfard S, Bamdad T, Hashemi H, Bandehpour M, Kazemi B. 2012. Induction of protective anti-CTL epitope responses against HER-2-positive breast cancer based on multivalent T7 phage nanoparticles. *PLoS One.* 7(11):e49539.
- Priehl B, Meindl C, Roblegg E, Pieber TR, Lanzer G, Fröhlich E. 2014. Nano-sized and micro-sized polystyrene particles affect phagocyte function. *Cell Biol Toxicol.* 30(1):1-16.
- Rajendran V, König A, Rabe KS, Niemeyer CM. 2010. Photocatalytic activity of protein-conjugated CdS nanoparticles. *Small.* 6(18):2035-40.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 80(1-2):148-58.
- Rhee JK, Baksh M, Nycholat C, Paulson JC, Kitagishi H, Finn MG. 2012. Glycan-targeted virus-like nanoparticles for photodynamic therapy. *Biomacromolecules.* 13(8):2333-8.
- Richter AW, Akerblom E. 1984. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 74(1):36-9.
- Romberg B, Oussoren C, Snel CJ, Carstens MG, Hennink WE, Storm G. 2007. Pharmacokinetics of poly(hydroxyethyl-L-asparagine)-coated liposomes is superior over that of PEG-coated liposomes at low lipid dose and upon repeated administration. *Biochim Biophys Acta.* 1768(3):737-43.
- Royston E, Ghosh A, Kofinas P, Harris MT, Culver JN. 2008. Self-assembly of virus-structured high surface area nanomaterials and their application as battery electrodes. *Langmuir.* 24(3):906-12.
- Satelli A, Li S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 68(18):3033-46.
- Sawant RR, Sriraman SK, Navarro G, Biswas S, Dalvi RA, Torchilin VP. 2012. Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials.* 33(15):3942-51.

- Singh P, Prasuhn D, Yeh RM, Destito G, Rae CS, Osborn K, Finn MG, Manchester M. 2007. Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo. *J Control Release*. 120(1-2):41-50.
- Stano A, Nembrini C, Swartz MA, Hubbell JA, Simeoni E. 2012. Nanoparticle size influences the magnitude and quality of mucosal immune responses after intranasal immunization. *Vaccine*. 30(52):7541-6.
- Steinmetz NF. 2010. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine*. 6(5):634-41.
- Steinmetz NF. 2013. Viral Nanoparticles in Drug Delivery and Imaging. *Mol. Pharmaceutics*. 10(1):1-2.
- Stubbs G. 1990. Molecular structures of viruses from the tobacco mosaic group. *Semin. Virol.* 1. 405-412.
- Suci PA, Varpness Z, Gillitzer E, Douglas T, Young M. 2007. Targeting and photodynamic killing of a microbial pathogen using protein cage architectures functionalized with a photosensitizer. *Langmuir*. 23(24):12280-6.
- Terada T, Iwai M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M.J. 2006. Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *Control Release*. 111(3):333-42.
- Teschke CM, McGough A, Thuman-Commike PA. 2003. Penton release from P22 heat-expanded capsids suggests importance of stabilizing penton-hexon interactions during capsid maturation. *Biophys J*. 84(4):2585-92.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 4(5):346-58.
- Tissot AC, Spohn G, Jennings GT, Shamshiev A, Kurrer MO, Windak R, Meier M, Viesti M, Hersberger M, Kündig TM, Ricci R, Bachmann MF. 2013. 43(3):716-22. A VLP-based vaccine against interleukin-1 α protects mice from atherosclerosis. *Eur J Immunol*.
- Torchilin V. 2009. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 71(3):431-44.
- Tóthová L, Bábíčková J, Celec P. 2012. Phage survival: the biodegradability of M13 phage display library in vitro. *Biotechnol Appl Biochem*. 59(6):490-4.
- Treuel L, Brandholt S, Maffre P, Wiegeler S, Shang L, Nienhaus GU. 2014. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle-cell interactions. *ACS Nano*. 8(1):503-13.
- Tu Y, Kim JS. 2008. A fusogenic segment of glycoprotein H from herpes simplex virus enhances transfection efficiency of cationic liposomes. *J Gene Med*. 10(6):646-54.
- Udit AK, Everett C, Gale AJ, Reiber Kyle J, Ozkan M, Finn MG. 2009. Heparin antagonism by polyvalent display of cationic motifs on virus-like particles. *ChemBiochem*. 10(3):503-10.
- van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. 2007. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm Res*. 24(8):1405-14.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324(5930):1029-33.
- Varela JA, Bexiga MG, Åberg C, Simpson JC, Dawson KA.J. 2012. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *Nanobiotechnology*. 10:39.
- Venter PA, Dirksen A, Thomas D, Manchester M, Dawson PE, Schneemann A. 2011. Multivalent display of proteins on viral nanoparticles using molecular recognition and chemical ligation strategies. *Biomacromolecules*. 12(6):2293-301.
- Verma A, Uzun O, Hu Y, Han HS, Watson N, Chen S, Irvine DJ, Stellacci F. 2008. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*. 7(7):588-95.
- Vert M, Yoshiharu D, Hellwich KH, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, Schué F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem*. 377-410.

- Villanueva A, Cañete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, Morales Mdel P, Miranda R. 2009. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*. 20(11):115103.
- Wang Q, Lin T, Johnson JE, Finn MG. 2002. Natural supramolecular building blocks. Cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol*. 9(7):813-9.
- Wang S, Low PS. 1998. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J Control Release*. 53(1-3):39-48
- Webster R, Elliott W, Kevin PB, Walker D, Hankin M, Taupin P. 2009. PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. *Milestones in Drug Therapy*. pp 127-146.
- Wen AM, Rambhia PH, French RH, Steinmetz NF. 2013. Design rules for nanomedical engineering: from physical virology to the applications of virus-based materials in medicine. *J Biol Phys*. 39(2):301-25.
- Wen AM, Ryan MJ, Yang AC, Breitenkamp K, Pokorski JK, Steinmetz NF. 2012b. Photodynamic activity of viral nanoparticles conjugated with C60. *Chem Commun (Camb)*. 48(72):9044-6.
- Wen AM, Shukla S, Saxena P, Aljabali AA, Yildiz I, Dey S, Mealy JE, Yang AC, Evans DJ, Lomonosoff GP, Steinmetz NF. 2012a. Interior engineering of a viral nanoparticle and its tumor homing properties. *Biomacromolecules*. 13(12):3990-4001.
- Won YY, Lee H. 2013. "pH phoresis": a new concept that can be used for improving drug delivery to tumor cells. *J Control Release*. 170(3):396-400.
- Worthington KL, Adamcakova-Dodd A, Wongrakpanich A, Mudunkotuwa IA, Mapuskar KA, Joshi VB, Allan Guymon C, Spitz DR, Grassian VH, Thorne PS, Salem AK. 2013. Chitosan coating of copper nanoparticles reduces in vitro toxicity and increases inflammation in the lung. *Nanotechnology*. 24(39):395101.
- Yamakoshi Y, Sueyoshi S, Miyata N. 1999. Biological activity of photoexcited fullerene. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*. (117):50-60.
- Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*. 5(13):1553-61.
- Zhang XD, Wu D, Shen X, Liu PX, Yang N, Zhao B, Zhang H, Sun YM, Zhang LA, Fan FY. 2011. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 6:2071-81.
- Zhu L, Torchilin VP. 2013. Stimulus-responsive nanopreparations for tumor targeting. *Integr Biol (Camb)*. (1):96-107.